

THESIS

MUNICH

1965

**Über die Beeinflussung der
Cytochromoxydaseaktivität durch
Thyroxin**

Walter Wenninger

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. Johannes BRÜGGEMANN

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG
DER CYTOCHROMOXYDASEAKTIVITÄT
DURCH THYROXIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Walter Wenninger
aus Wemding/Bay.

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. L. KOTTER
Referent: Prof. Dr. Dr. Johs. BRÜGGEMANN
Tag der Promotion: 26. Februar 1965

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	IV
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	2
III. MATERIAL UND METHODIK	8
a) Tiermaterial	9
b) Herstellung der Cytochromoxydasepräparate	10
c) Der Indophenol-Test nach STRAUS (27) mit minimaler Cytochrom-c-Konzentration	12
d) Eichkurve zur Bestimmung des "Thyroxin- anteils" an der Geschwindigkeit des Elektronentransportes durch die Atmungskette	21
IV. ERGEBNISSE	24
V. DISKUSSION	29
VI. ZUSAMMENFASSUNG	32
VII. LITERATURVERZEICHNIS	34
LEBENS LAUF	

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

abs.	=	absolut
BEJ	=	mit Butanol extrahierbares Jod
Diamin	=	Dimethyl-p-phenylendiamin
DPN	=	Diphosphopyridinnukleotid
E	=	Extinktion
KG	=	Körpergewicht
mcg = γ	=	Mikrogramm (Gamma)
MTU	=	Methylthiourazil
m μ	=	Millimikron
NAD-H	=	Nikotinamid-Adenindinukleotid, hydriert
NADP-H	=	Nikotinamid-Adenindinukleotidphosphat, hydriert
nm	=	nano-Meter, 10^{-9} m
nMol	=	nano-Mol, 10^{-9} Mol
Oxydase	=	Cytochromoxydase
RZ	=	Rohrzucker
s. c.	=	subcutan
s. u.	=	siehe unten
Titriplex	=	Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
Tris	=	Trishydroxymethylaminomethan
u. d. N.	=	unter der Nachweisgrenze

I. EINLEITUNG

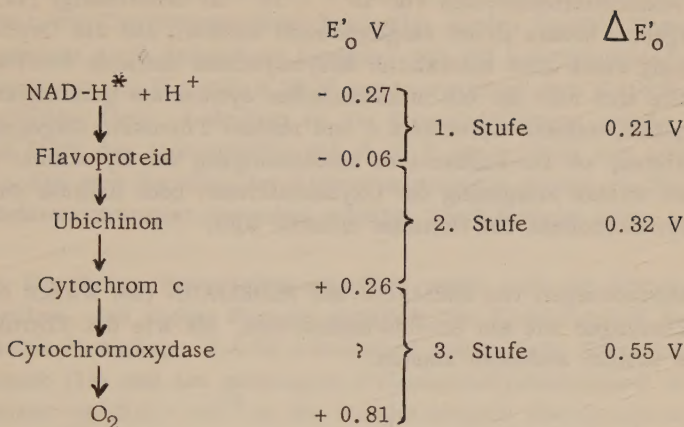
Bei der Frage nach der biochemischen Wirkungsweise des Thyroxins tritt immer wieder die Vermutung in den Vordergrund, daß die Aktivität der Cytochromoxydase - des letzten Enzyms der Atmungskette und damit der Endoxydation - durch die Schilddrüsenhormone beeinflusst wird. Eine Aktivierung gerade dieses Fermentes kann nämlich zu einem "Oxydations-Sog" führen, der über die gesamte Kette der Umsetzungen bis zu den Nahrungsbausteinen - Kohlenhydraten, Fettsäuren und Aminosäuren, die im Rahmen des Energiestoffwechsels oxydiert werden - zurückreicht. Zahlreiche Autoren haben auch in der Tat zeigen können, daß der Elektronentransport durch die Atmungskette nach Thyroxingaben beschleunigt ist und nach Thyreoidektomie bzw. nach Vorbehandlung mit Thiouracilderivaten abnimmt. Durch derartige Versuche ließ sich allerdings noch nicht entscheiden, ob dieser Effekt durch direkte Aktivierung der Cytochromoxydase, durch zusätzliche Neubildung von Enzymprotein (Enzyminduktion) oder durch Einschalten des Thyroxins als Potentialbrücke - dem Redoxpotential entsprechend zwischen dem Cytochrom c und der Cytochromoxydase - erzielt wird. Es war besonders aus methodischen Gründen schwierig, zwischen diesen Möglichkeiten zu differenzieren, weil sich die Cytochromoxydase-Aktivität nur durch Oxydation eines Substrates, z. B. eines Phenols, unter Einschaltung von Cytochrom c oder durch direkte Messung der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation bestimmen läßt. Bei diesem Vorgehen wird aber eine Aktivitätsänderung ebenso als Beschleunigung oder Hemmung der Phenol- bzw. Cytochrom-c-Oxydation erfaßt wie die Konzentrationsänderung einer "Potentialbrücke", die sich unterhalb des Cytochroms c in die Atmungskette einordnet. Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit versucht werden, ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe eine separate Messung der Cytochromoxydaseaktivität und damit eine Beantwortung dieser noch offenen Fragen möglich ist.

II. LITERATUR

Die Hypothese von MARTIUS (1), nach der die verminderte Synthese energiereicher Phosphatverbindungen, die von verschiedenen Laboratorien bei Lebermitochondrien und Herzsarkosomen in Gegenwart von Thyroxin und Trijodthyronin beobachtet werden konnte (2, 3), für die biologische Wirkung der Schilddrüsenhormone verantwortlich zu machen ist, kann aufgrund neuerer Untersuchungen nicht mehr aufrechterhalten werden. Schon seit vielen Jahren ist bekannt, daß eine intakte Schilddrüsenfunktion für Wachstumsvorgänge unentbehrlich ist. Da das Wachstum aber eine intakte und sogar besonders intensive Synthese energiereicher Phosphate zur Voraussetzung hat, konnte den Vorstellungen von MARTIUS schon aus diesem Grunde nur eine begrenzte Gültigkeit zuerkannt werden. Tatsächlich haben dann Versuche von SOKOLOFF und KAUFMANN (4, 5) und etwa gleichzeitig von BRONK und BRONK (6) gezeigt, daß die Schilddrüsenhormone in dem Konzentrationsbereich, der physiologisch bedeutungsvoll ist (10^{-7} - 10^{-8} m), die Anlieferung von Adenosintriphosphorsäure (ATP) und parallel dazu die Proteinsynthese stimulieren. Diese Ergebnisse konnten von HESS (7) und ebenso von SCHOLE (8) reproduziert werden. Damit präsentiert sich die Aktionssteigerung der Atmungskette einschließlich der oxydativen Phosphorylierung als entscheidende, vielleicht ausschließliche Wirkungsweise dieser Hormongruppe. Denn alle Effekte, die den Jod-Thyroninen bisher zugeschrieben wurden, lassen sich als Folge dieser Primärwirkung verstehen: Durch Intensivierung der Umsetzungen in der Atmungskette wird ein "Oxydations-Sog" erzeugt, der bis zu den Nahrungsbausteinen zurückreicht und zu einer Änderung der bestehenden Fließgleichgewichte führt, die wiederum durch eine damit verknüpfte Verschiebung der Substratspiegel die Adaptation an die neue Stoffwechsellage durch zusätzliche Synthese der Enzyme einleitet, die in vermehrtem Umfang benötigt werden.

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse stellt sich die Frage nach der Wirkungsweise der Schilddrüsenhormone praktisch als Frage nach dem Zustandekommen des primären stimulierenden Effektes auf die Atmungskette. Zur Erklärung dieses Phänomens sind in erster Linie Arbeiten zu nennen, in denen eine Steigerung der Cytochromoxydase-Aktivität beschrieben wurde. Durch Aktivierung dieses letzten Enzyms der Atmungskette dürfte verständlicherweise in besonderem Maße eine Beschleunigung des Elektronenflusses erreicht werden, weil ein von hier ausgehender "Sog" alle drei Stufen der

Atmungskette erfaßt:



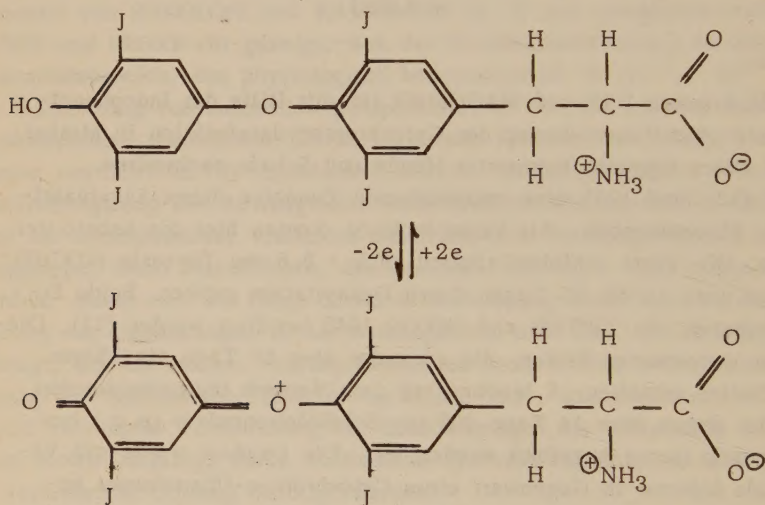
Schon 1928 konnten DYE und WAGGENER (9) mit Hilfe der Indophenolblau methode eine Verminderung der Cytochromoxydasefunktion in Muskel, Leber und Niere thyreoidektomierter Hunde und Schafe nachweisen. MARKOFF (10) fand 1935 eine entsprechende Zunahme dieser Enzymaktivität nach Thyroxingaben. Als Versuchsobjekt dienten hier die Lebern weißer Ratten. Die Tiere erhielten täglich 0.2 - 0.5 mg Thyroxin (ROCHE) und wurden nach 10 bis 25 Tagen durch Dekapitation getötet. Beide Ergebnisse konnten von TIPTON und NIXON 1946 bestätigt werden (11). Diese Autoren verwendeten Ratten, die entweder über 20 Tage ein 1%iges Thiouracilfutter erhielten, 6 Wochen vor dem Versuch thyreoidektomiert wurden oder denen über 14 Tage 400 mg Schilddrüsenpulver (p.o.) bzw. 5 mg Thyroxin (s.c.) zugeführt worden war. Die Oxydase wurde mit Vitamin C als Substrat in Gegenwart eines Cytochrom-c-Überschusses bestimmt. Nach den mitgeteilten Ergebnissen nahm die Ascorbinsäureoxydation durch Rattenleber-Cytochromoxydase unter den genannten Bedingungen nach Thiouracilfütterung um 18%, nach Thyreoidektomie um 4.5% ab, während die Behandlung mit Schilddrüsenpulver bzw. mit Thyroxin Zunahmen um 16 bzw. 13% bewirkte.

Diese Befunde wurden schließlich im Jahre 1959 durch die Beobachtung erweitert, daß L-Thyroxin in gleicher Weise wie 2,4-Dinitrophenol und L-Adrenalin in vivo und in vitro die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-

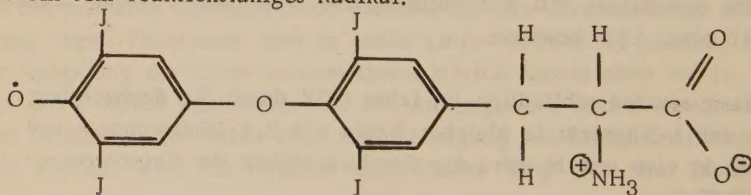
* früher DPN-H

Oxydation durch ein gereinigtes Cytochromoxydasepräparat in dem physiologischen Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-8} m beschleunigt (12). Durch dieses Ergebnis konnte sicher ausgeschlossen werden, daß die Oxydationsstimulierung durch eine zusätzliche Enzymsynthese zustande kommt, denn es handelte sich hier um ein übersichtliches System aus gereinigter Cytochromoxydase, reinem Cytochrom c und reinem Thyroxin. Dagegen war jetzt zu diskutieren, ob die beobachtete Beschleunigung der Cytochrom-c-Oxydation durch direkte Steigerung der Oxydaseaktivität oder indirekt durch einen Potentialbrückeneffekt des Hormons erreicht wird.

Nach Untersuchungen von NIEMANN und REDEMANN (13) wirken nur solche Verbindungen wie ein Schilddrüsenhormon, die wie das Thyroxin ein chinoides System ausbilden können:



Dieser oxydative Übergang vom Thyroxin zum Thyroxin-Chinon verläuft über ein sehr reaktionsfähiges Radikal:



Durch kontinuierlichen Wechsel zwischen der chinoiden und der Radikalform ist ein Redox-System denkbar, durch das der Elektronentransport vom Cytochrom c zur Cytochromoxydase begünstigt werden könnte. Diese Möglichkeit gewinnt noch dadurch an Realität, daß das Redoxpotential der Schilddrüsenhormone (E') mit 0.38 V genau zwischen dem Cytochrom c und der Oxydase liegt. Außerdem ist die Potentialdifferenz gerade bei dieser dritten Stufe der Atmungskette mit 0.56 V am größten von allen drei Stufen, so daß eine Senkung der Aktivierungsenergie gerade an dieser Stelle den Elektronentransport besonders wirksam beschleunigen kann.

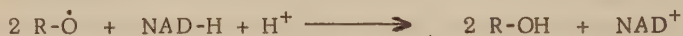
Für einen kinetischen Potentialbrückeneffekt würde auch die bekannte Tatsache sprechen, daß andere Phenole ebenfalls den Elektronenfluß durch die Atmungskette verstärken. 2,4-Di-nitrophenol erhöht beim Säugetier den O_2 -Verbrauch (14) und am gereinigten Cytochromoxydasepräparat in einer Konzentration von $3.5 \cdot 10^{-6}$ m die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation (12). Adrenalin verhält sich in vivo und ebenso in vitro bei einer Konzentration von $2.7 \cdot 10^{-7}$ m entsprechend. Aber auch p-Aminosalicylsäure steigert in vitro bei Rattenhirnschnitten den Sauerstoffverbrauch (15). Als Substrat wurde bei diesen zuletzt erwähnten Versuchen Glukose und Brenztraubensäure angeboten.

Weiterhin sind Versuche zu nennen, die in übersichtlichen Systemen deutlich zeigen, daß dem Thyroxin eine elektronenübertragende Wirkung zuzuerkennen ist. Cu^{++} -Ionen werden z. B. leicht durch das phenolische Hydroxyl des Hormons zu Cu^+ reduziert. Tyrosin und Dibromtyrosin, die biologisch nur wenig aktiv sind, reagieren nur sehr schwach (16). Auch die Ascorbinsäureoxydation mittels pflanzlicher Ascorbinsäureoxydase kann in einem Konzentrationsbereich von etwa 10^{-5} m durch Thyroxin erhöht werden (17). Eine ähnliche Versuchsanstellung wählte KLEBANOFF (18), der die NAD-H-Oxydation in dem Peroxydase- H_2O_2 -System verfolgte. Diese Reaktion wird besonders stark durch Thyroxin beschleunigt. Schon Versuche von AKAZAWA und CONN (19) führten zu dem Ergebnis, daß die NAD-H-Oxydation durch verschiedene Phenole katalysiert, durch andere wiederum gehemmt wird. Zu den stimulierenden Verbindungen zählen Resorcin, 2,4-Dichlorphenol, p-Cresol und α -Naphthol, während Hydrochinon und Brenzkatechin hemmend wirken. Vorversuche von KLEBANOFF (20) haben dann gezeigt, daß die Oxydation von Adrenalin, Dihydroxyphenylalanin und Harnsäure in dem Peroxydase- H_2O_2 -System durch Thyroxinkonzentra-

tionen von $3.3 \cdot 10^{-5}$ m stimuliert wird. Auch D,L-Thyronin war aktiv, nicht jedoch die Verbindungen, in denen das phenolische Hydroxyl veräthert war. Die Hydroxylgruppe ist demnach - wie zu erwarten - für die katalytische Redox-Funktion essentiell. In einer weiteren Mitteilung konnte KLEBANOFF (18) dann berichten, daß auch die Oxydation hydrierter Pyridinnukleotide (NAD-H und NADP-H) mittels Peroxydase und H_2O_2 durch die Schilddrüsenhormone erheblich gesteigert wird. Allen diesen Reaktionen dürfte das folgende Prinzip zugrunde liegen, das ebenfalls die Redox-Funktion dieser Hormongruppe in den Vordergrund der Betrachtung rückt (19). Das phenolische Hydroxyl wird zuerst peroxydatisch zum Radikal umgesetzt:



In zweiter Reaktion erfolgt dann die Oxydation des Pyridinnukleotids durch diese Sauerstoffradikale:



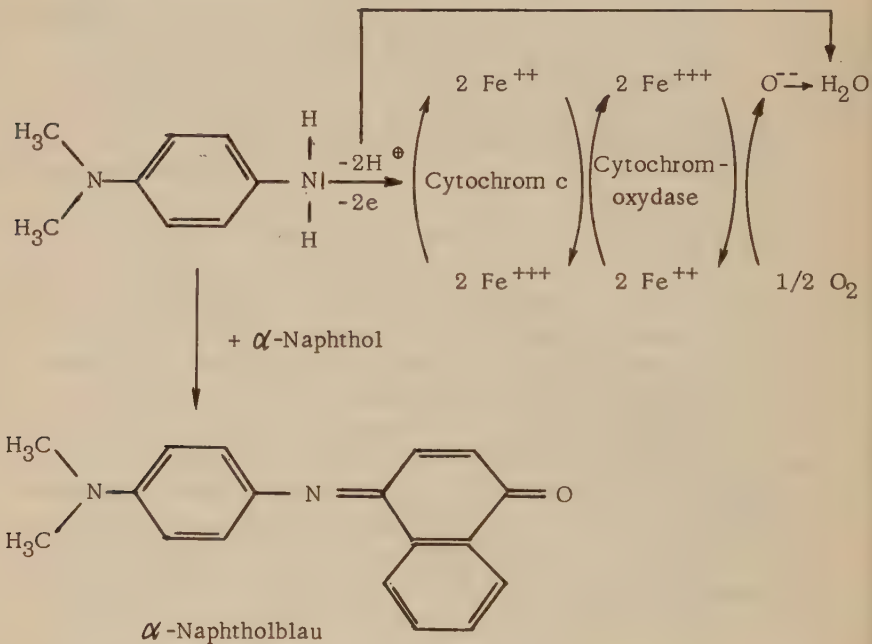
In Anbetracht dieser Befunde ist es nicht erstaunlich, daß dem Thyroxin auch bei niederen Organismen eine den O_2 -Verbrauch anregende Wirkung zuzuerkennen ist. Diesbezügliche Messungen von MARX und Mitarb. (21) zeigen eindeutig, daß der O_2 -Verbrauch von Hefezellen nach Vorinkubation mit $4 \cdot 10^{-5}$ m L-Thyroxin erhöht ist. Dieselben Ergebnisse wurden auch an Bakterienzellen gewonnen: Nach WEINFAN und MARX (22) wird die bakterielle Oxydation von Glukose und auch von Cholesterin durch L-Thyroxin und L-Trijodthyronin beschleunigt. Auch diese Beobachtungen lassen sich am ehesten durch einen zellunspezifischen Potentialbrückeneffekt derartiger Verbindungen deuten, denn die Potentialdifferenzen zwischen den Cytochromen und der Cytochromoxydase sind in allen Zellen etwa gleich groß.

Eine Sichtung dieser bisher verfügbaren Meßergebnisse zeigt deutlich, daß sich das Prinzip der Schilddrüsenhormonwirkung offensichtlich in der stimulierenden Wirkung auf die Atmungskette erschöpft. Diese Stimulation kann nun - wie schon erwähnt - einerseits durch direkte, andererseits durch indirekte Aktivierung der Cytochromoxydase über einen Potentialbrückeneffekt zustande kommen. Um zwischen diesen beiden Alternativen

entscheiden zu können, wäre es notwendig, die Cytochromoxydase mit einem Test zu erfassen, der durch keine Thyroxinkatalyse überlagert werden kann. Da sich alle bisher verwendeten Verfahren auf die Oxydation eines Phenols unter Zwischenschaltung des Cytochroms c stützen, bei der die durch Thyroxin beeinflussbare Stufe Cytochrom-c-Cytochromoxydase miterfaßt wird, konnte diese Frage bisher nicht beantwortet werden. Die folgende Arbeit dient daher dem Versuch, einen entsprechenden Test zu entwickeln und damit zu entscheiden, in welcher Weise die Jod-Thyronine die Umsetzungen in der Atmungskette stimulieren.

III. MATERIAL UND METHODIK

Die bisherigen Ausführungen haben gezeigt, daß bei den verwendeten Verfahren zur Bestimmung der Cytochromoxydase nicht nur die Oxydase-Aktivität, sondern gleichzeitig die Geschwindigkeit des Elektronentransportes vom Cytochrom c zum Sauerstoff erfaßt wird. Die folgende Reaktionskette wurde getestet, wobei man das Dimethyl-p-phenylendiamin durch andere Elektronendonatoren, z. B. Ascorbinsäure, ersetzen kann:



Da das Cytochrom c im Überschuß zugesetzt wurde, war in allen Fällen der Schritt vom Cytochrom c zur Cytochromoxydase für den Gesamtumsatz begrenzend (lineare Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Enzymkonzentration). Das Dimethyl-p-phenylendiamin ist so hoch konzentriert, daß alles Cytochrom c in kurzer Zeit reduziert wird, und der Sauerstoff liegt ebenfalls in einer Konzentration vor, die eine augenblickliche Reoxy-

dation der Oxydase ermöglicht. Bei dieser Meßanordnung könnte also durch zusätzliche Katalysatoren - etwa eine Potentialbrücke - die Cytochrom-c-Oxydation beschleunigt werden. Um einen derartigen Potentialeffekt auszuschalten, müßte man den Ansatz derart variieren, daß der Cytochrom-c-Anteil den Elektronentransport begrenzt. Dann wäre die Oxydase-Konzentration sehr viel größer als die Cytochrom-c-Konzentration, und eine Potentialbrücke würde sich nur noch minimal auswirken können. Um die Richtigkeit dieser Überlegungen experimentell überprüfen zu können, wurden auf verschiedenen Wegen Oxydasepräparate bereitet.

a) Tiermaterial

Für alle Versuche wurden Sprague-Dawley-Männchen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 250 g verwendet, die mit einer institutseigenen Diät ("Zuchtfutter grün") folgender Zusammensetzung gefüttert worden waren (in Teilen):

45 Weizenschrot	+) Mineralstoffmischung:
33 Maisschrot	40 % kohlensaurer Futterkalk
15 Sojaschrot	30 % phosphors. Futterkalk
3 Magermilchpulver	24.5 % Viehsalz
2 Luzernegrünmehl	5 % Magnesiumsulfat
2 Mineralstoffmischung ⁺⁾	0.5 % Spurenelemente als Sulfate
	(Fe, Cu, Mn, Co =
	5 : 1.5 : 1 : 0.2)

Bei einem Teil der Ratten wurde das Futter mit 0.2% Methylthiouracil (MTU) angereichert, einzelne wurden zusätzlich vor der MTU-Zufütterung folgendermaßen thyreidektomiert:

Die über Nacht ausgenücherten Tiere erhielten zwei Stunden vor der Operation pro 100 g KG 1 ml einer physiologischen Kochsalzlösung, die 5% Glucose enthielt, subcutan injiziert. Die Narkose wurde mit einem Ätherrausch eingeleitet. Die Ratte wurde dazu in ein Glasgefäß gebracht, das einen mit Äther getränkten Wattebausch enthielt. Sobald das Tier ruhig auf der Seite lag, wurde es aus dem Äthermilieu herausgenommen und erhielt dann eine 1%ige "Thiogenal"-Lösung (5-methylthioäthyl-5-(1-methylbutyl-thiobarbitursäure) intraperitoneal injiziert. Die Dosis betrug 60 mg/kg KG,

die nach Bedarf in halber Menge nachgespritzt wurde.

Nachdem das Tier in Rückenlage fixiert worden war, wurde die ventrale Halspartie rasiert und desinfiziert. Dann wurde die Haut in der Medianen von der Brustapertur bis in die Höhe der beiden Unterkieferwinkel gespalten und das darunterliegende Gewebe stumpf getrennt. Die darauf folgende Muskelplatte des M. sternocephalicus wurde ebenfalls median stumpf mit 2 Pinzetten getrennt und mit Wundhaken auseinandergezogen. Beiderseits der Trachea, an deren kranialen Ende, waren dann die beiden Schilddrüsen etwa stecknadelkopfgroß gut zu erkennen. Die beiderseits der Trachea ventrolateral zur Schilddrüse ziehenden Arterien wurden mit einem glühenden Eisenspatel kauterisiert. Nachdem die Schilddrüsen vom umliegenden Gewebe abgetrennt worden waren, wurden sie mit einer Pinzette angehoben und mit dem Skalpell abgetrennt. Das an der Trachea verbleibende Drüsengewebe wurde mit dem glühenden Eisenspatel säuberlich eingeschmolzen, die Wunde mit einer Hautnaht geschlossen und mit Marfanil-Prontalbin-Puder bestreut.

b) Herstellung der Cytochromoxydasepräparate

An erster Stelle wurde ein einfaches Rattenleberhomogenat gewonnen, in dem die Fermentaktivität auch bei den späteren Versuchen (s.u.) bestimmt werden sollte. Die Tötung der Ratten erfolgte durch Genickschlag. 600 mg Leber wurden in 5 ml eiskalter Rohrucker-(RZ)-Lösung (17 g RZ ad 200 ml bidest. Wasser) homogenisiert (BÜHLER-Homogenisator), bei 3000 Upm fünf Minuten zentrifugiert und der erhaltene Überstand nach entsprechender Verdünnung (s.u.) für die Versuche verwendet (Oxydase I).

Um höhere Oxydasekonzentrationen zu erhalten und um das endogene Thyroxin zu entfernen, wurde das Enzym nach einer Vorschrift von KEILIN und HARTREE (23) aus Rattenherzen angereichert.

5 Rattenherzen wurden in Eiswasser mit einer Schere zerkleinert, unter Eiskühlung und mechanischem Rühren zehnmal ausgewaschen und anschließend in Trishydroxymethylaminomethan-(Tris)-RZ-Pufferlösung (0.05 m Tris-Puffer, p_H 7.0) bei 0°C 3 Minuten im BÜHLER-Homogenisator fein zerschlagen. Das gewonnene Homogenat wurde in einer Kühlzentrifuge 10 Minuten bei 20 000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Bo-

densatz wurde noch einmal in RZ-Tris-Puffer gewaschen, anschließend in 5 ml RZ-Puffer aufgenommen und 1 Minute homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren bei 20 000 Upm enthielt die überstehende Flüssigkeit eine hohe Oxydase-Aktivität und war frei von allen wasserlöslichen Bestandteilen, die nicht an Partikel gebunden sind, also auch frei von Thyroxin und Cytochrom c. Das Präparat konnte somit für die beabsichtigten Versuche herangezogen werden (Oxydase II).

Zur weiteren Sicherung der Ergebnisse wurde außerdem noch eine hochgereinigte, spektral einheitliche Oxydase hergestellt (24).

Nach Angaben von CRANE und Mitarb. (25) wurden zuerst Rinderherz-mitochondrien gewonnen: 400 g Rinderherz (schlachtfrisch) wurden in einem Fleischwolf zerkleinert und dann nach Zusatz von 1 200 ml RZ-Lösung, die 1.85 g KH_2PO_4 /Liter enthielt, im BÜHLER-Homogenisator unter Eiskühlung fein zerschlagen. Der pH -Wert wurde mit Hilfe von 6 n KOH immer zwischen 7.2 und 7.4 gehalten. Zur Entfernung grober Gewebepartikel wurde anschließend 10 Minuten bei 2000 Upm und dann zur Gewinnung der Mitochondrienfraktion weitere 10 Minuten bei 20 000 Upm zentrifugiert. Die separierten Mitochondrien wurden dann im Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM homogenisiert und mit RZ-Lösung gewaschen. Das Sediment wurde in Tris-RZ-Histidin-Puffer (0.05 m Tris, 0.66 m RZ und 0.001 m Histidin) suspendiert, und zwar betrug die Proteinkonzentration 23 mg pro ml. Der Proteingehalt wurde hier mit Hilfe der allgemein bekannten Biuret-Methode ermittelt. Jetzt wurden unter Rühren pro mg Protein 0.3 mg Desoxycholat (in 10%iger Lösung) und pro Liter 72 mg KCl zugegeben. Nach vollständiger Lösung des Kaliumchlorids wurde 30 Minuten bei 20 000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Vom Sediment wurde die mittlere, grün-gefärbte Schicht vorsichtig abgetrennt und in Tris-RZ-Histidin-Puffer suspendiert (Proteinkonzentration 19 mg/ml). Nach nochmaliger Zugabe von Desoxycholat (0.5 mg/mg Protein) und KCl (74.5 g pro Liter) wurde 20 Minuten bei 20 000 Upm zentrifugiert und der die Oxydase enthaltende Überstand 90 Minuten gegen das 30fache Volumen einer 0.01 m Trispufferlösung (pH 8.0) dialysiert. Dann wurde unter Rühren eine bei 20°C gesättigte und mit NH_4OH auf einen pH -Wert von 7.8 eingestellte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt (0.19 ml/ml Dialysat) und die Fällung nach 10 Minuten abzentrifugiert. Durch weiteren Zusatz von 0.04 ml der gleichen Ammoniumsulfatlösung pro ml Überstand wurde noch eine zweite Fraktion gewonnen, in der die Oxydase in hochreiner

Form enthalten war und die - in etwa 10 ml Tris-RZ-Histidinpuffer gelöst - nach entsprechender Verdünnung für die Versuche verwendet wurde (Oxydase III). Zur Reinheitskontrolle wurde das Spektrum aufgenommen, das mit den von GRIFFITHS und WHARTON (26) angegebenen Daten übereinstimmte (Abb. 1).

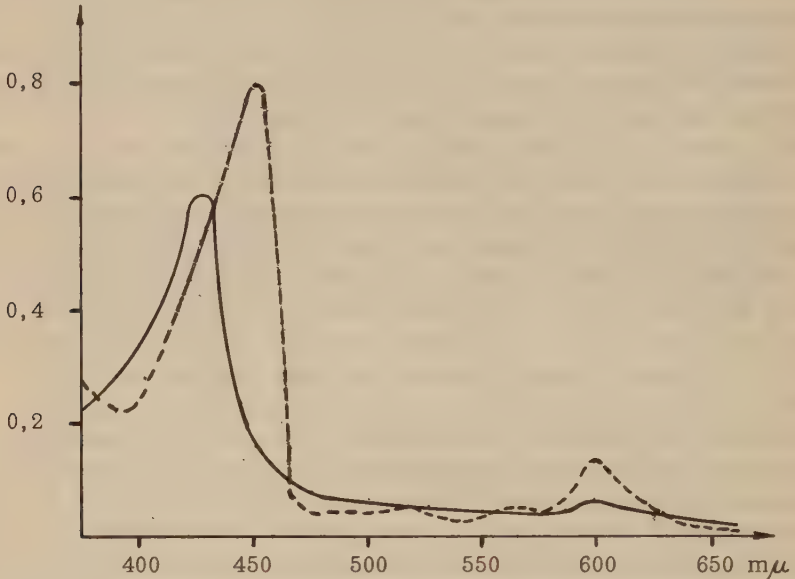


Abb. 1: Absorptionsspektrum der Cytochromoxydase III

— oxydiert mit Sauerstoff
----- reduziert mit Natriumdithionit

c) Der Indophenol-Test nach STRAUS (27) mit minimaler Cytochrom-c-Konzentration

Es wurde schon erwähnt, daß die Indophenolmethode nach STRAUS (27) theoretisch nur dann eine spezifische Bestimmung der Cytochromoxydase-Aktivität ermöglicht, wenn das Cytochrom c für den Elektronendurchgang begrenzend ist. Es war daher zu überprüfen, ob und in welchem Umfang die Steigerung der Indophenolbildung durch Thyroxin von der Cytochrom-c-Konzentration abhängig ist.

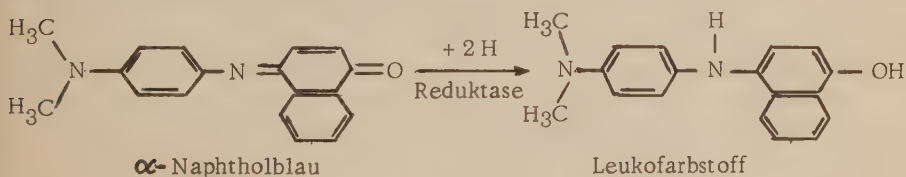
Zuerst wurden die allgemeinen Bedingungen des Testes kontrolliert (Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Reaktionszeit, der Fermentkonzentration etc.). Der folgende Ansatz wurde in ein Zentrifugenglas (Volumen 10 ml) pipettiert:

- 0.6 ml Trispuffer (p_H 7.8)
- 0.25 ml α -Naphthol-Lösung (0.1%ig in 22%igem Alkohol)
- 0.35 ml Dimethyl-p-phenylendiamin (0.1%ig in Wasser)
- 0.2 ml Wasser (bzw. Cytochrom c (s. u.))
- 0.1 ml Oxydase (I - III)
- 1.5 ml Gesamtvolumen

Um die günstigste Reaktionszeit in Erfahrung zu bringen, wurden verschiedene derartige Ansätze (Cytochrom-c-Konzentration $5 \cdot 10^{-8}$ m) ohne Ferment in einem Wasserbad von $37^\circ C$ 3 Minuten vorgewärmt und dann 0.1 ml der Oxydase I (1 ad 5 ml verdünnt) zugegeben. Nach 3, 6, 9 und 12 Minuten wurde die Reaktion durch Zusatz von 0.5 ml eines Chloroform-Alkoholgemisches (9 : 1) unterbrochen, auf 0° gekühlt, das gebildete α -Naphtholblau in einem Schütteltrichter mit 3×5 ml desselben Chloroform-Alkoholgemisches extrahiert und die sorgfältig abgetrennten Extrakte mit dem Extraktionsmittel auf 25 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Blaufärbung im Eppendorf-Photometer bei 578 nm (Schichtdicke 2 cm) gegen Wasser gemessen.

Unter gleichen Bedingungen wurden Blindwerte ohne Ferment angesetzt, um die Autoxydation des Diamins zu erfassen. Diese Autoxydationsquote wurde von dem gewonnenen Hauptwert (mit Enzym) in Abzug gebracht und damit der fermentativ gebildete Farbwert ermittelt, der als $\gamma\alpha$ -Naphthol, umgesetzt pro mg Protein, berechnet wurde. Die Proteinbestimmung erfolgte über Kjeldahl-N $\times 6.25$.

Weiterhin war hier die Indophenolreduktion zum Leukofarbstoff zu berücksichtigen, die bei ungereinigten Oxydasepräparaten - abhängig von der Reduktase-Aktivität - parallel zur Farbstoffbildung abläuft:

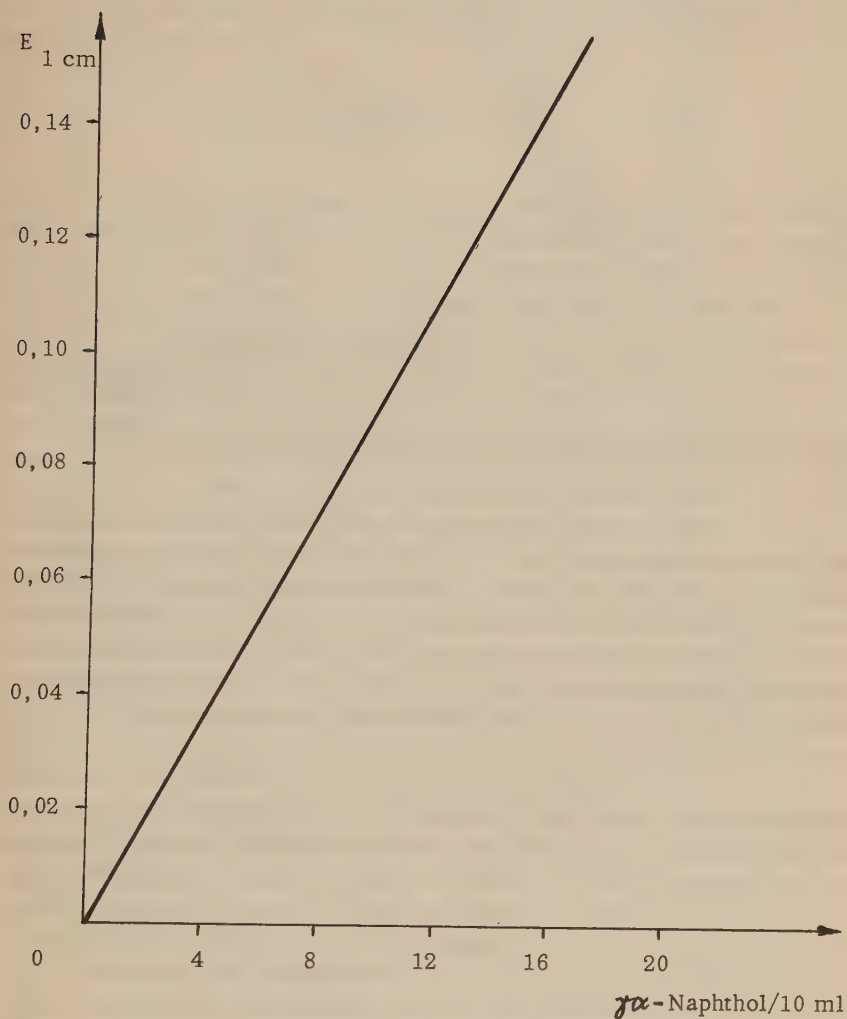


Zur Ermittlung dieser Reduktionsquote wurde einem separaten Doppelsatz 3 Minuten nach der Fermentzugabe KCN in einer Endkonzentration von 10^{-3} m zugesetzt. Die eine Hälfte des Ansatzes wurde sofort, die zweite nach weiteren 3 Minuten ausgeschüttelt und der Farbwert kolorimetrisch bestimmt. Aus der Differenz ergab sich die in 3 Minuten reduzierte Farbstoffmenge. Da die Reduktionsgeschwindigkeit bei allen Cytochrom-c-Konzentrationen, die bei diesem Test verwendet wurden, gleich groß ist, ändert sich die für die Oxydase-Aktivität allein charakteristische Steigung (tg-Wert) durch Berücksichtigung der Reduktion nicht, so daß diese Korrektur in diesem Zusammenhang entbehrlich ist.

Um den umgesetzten α -Naphthol-Anteil quantitativ angeben zu können, mußte noch eine Eichkurve erstellt werden. Hierzu wurde ein Überschuß an Oxydase und Diamin mit steigenden γ -Beträgen an α -Naphthol versetzt, der Farbwert nach 10 Minuten kolorimetrisch bestimmt und die gemessenen Extinktionen in ein Koordinatensystem eingetragen. Die erhaltene Gerade ist in der Abbildung 2 (Seite 15) wiedergegeben.

Wurde jetzt das in den angegebenen Zeiträumen gebildete α -Naphtholblau graphisch ausgewertet (Abb. 3, Seite 16), so ergab sich innerhalb 6 Minuten (3 Minuten Vorinkubation und 3 Minuten Reaktionszeit) eine lineare Zunahme der Farbstoffkonzentration. Diese Versuchszeit wurde daher bei allen folgenden Versuchen beibehalten.

Abb. 2: Eichkurve für die α -Naphthol-Oxydation



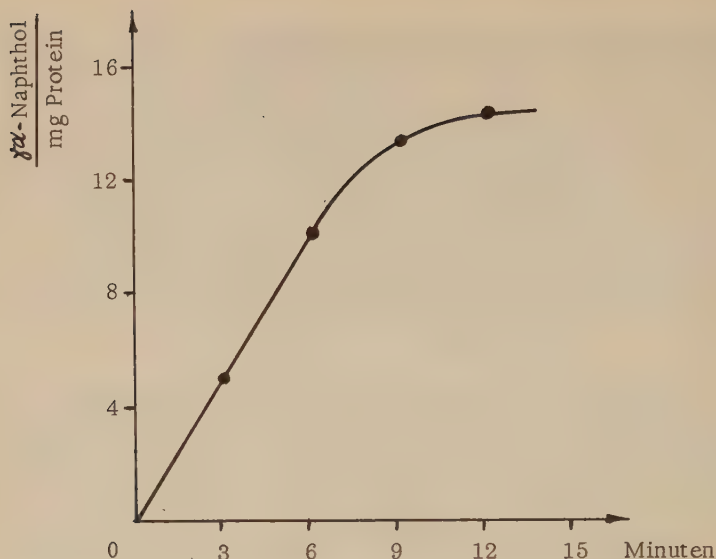


Abb. 3: Abhängigkeit der Indophenolbildung von der Reaktionszeit

An zweiter Stelle wurde unter genau gleichen Bedingungen die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Cytochrom-c-Konzentration ermittelt, die zwischen 10^{-8} und $2 \cdot 10^{-7}$ m variiert wurde. Wie die Abbildung 4 (Seite 18) zeigt, verläuft die Farbstoffbildung bei sehr kleinen Cytochrom-c-Konzentrationen (bis $6 \cdot 10^{-8}$ m) linear. Außerdem ist die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei diesen kleinen Cytochrom-c-Anteilen schon signifikant, so daß dieser Bereich zur Bestimmung der Oxydase-Aktivität herangezogen werden kann.

Schließlich wurde noch die Abhängigkeit von der Oxydase-Konzentration bestimmt, indem unterschiedliche Verdünnungen der Oxydase I hergestellt und zur Reaktion gebracht wurden. Wie die Abbildung 5 (Seite 18) zeigt, ist die bei der Messung mit verschiedenen Cytochrom-c-Konzentrationen erhaltene Steigung (tg des Steigungswinkels) der Oxydase-Konzentration direkt proportional, so daß sich diese Testanordnung zur Ermittlung der Oxydaseaktivität verwenden läßt, solange hinsichtlich der Oxydase- und Cytochrom-c-Konzentration im linearen Reaktionsbereich gearbeitet wird. Als günstigste Leberhomogenatmenge (Oxydase I) hat sich 0.1 ml einer Homogenatverdünnung (mit RZ-Lösung) von 1 ad 5 ml ergeben, als gün-

stigste Cytochrom-c-Zusätze Konzentrationen von $2.5 - 7.5 \cdot 10^{-8} \text{ m}$. Bei sehr geringen Oxydaseaktivitäten wurden teilweise noch Konzentrationen von 10^{-7} m eingesetzt.

Die Schwankungsbreite dieser Methode errechnete sich aus 10 Parallelmessungen nach der Formel

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n - 1}} \text{ zu } \pm 7.8\%.$$

Somit läßt sich als neues Maß für die Cytochromoxydase-Aktivität die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem Cytochrom-c-Angebot auswerten, die quantitativ im tg des Steigungswinkels zum Ausdruck kommt. Jetzt war noch der Nachweis zu erbringen, daß die Thyroxinwirkung auf die Geschwindigkeit der α -Naphtholblaubildung in beiden Testanordnungen (Cytochrom-c-Überschuß bzw. minimales Cytochrom-c-Angebot) tatsächlich unterschiedlich ist. Zur Prüfung dieser entscheidenden Frage wurden dem beschriebenen Ansatz wechselnde Thyroxinkonzentrationen zugegeben, und zwar wurde einmal in Gegenwart kleiner, steigender Cytochrom-c-Konzentrationen der Steigungswinkel, zum anderen bei hohem Cytochrom-c-Angebot die maximale Indophenolbildung gemessen. Die Ergebnisse, die mit den Oxydasepräparaten I und III erhalten wurden, sind in den Tabellen 1 (Seite 19) und 2 (Seite 20) zusammengefaßt. Bei den Versuchen mit der Oxydase III wurde der Ansatz vor der Enzymzugabe 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert (Tab. 1 und 2). Man erkennt deutlich, daß nur in Gegenwart hoher Cytochrom-c-Konzentrationen (10^{-6} m und höher) eine signifikante Steigerung der Farbstoffbildung erzielt werden kann, während bei Anwesenheit kleiner Cytochrom-c-Anteile keine Stimulierung zu beobachten ist. Schon diese Ergebnisse sprechen dafür, daß der Thyroxineffekt weder als direkte Aktivierung der Oxydase, noch als Förderung der Enzymneusynthese zu verstehen ist, sondern höchstwahrscheinlich durch einen Potentialbrückeneffekt zustande kommt.

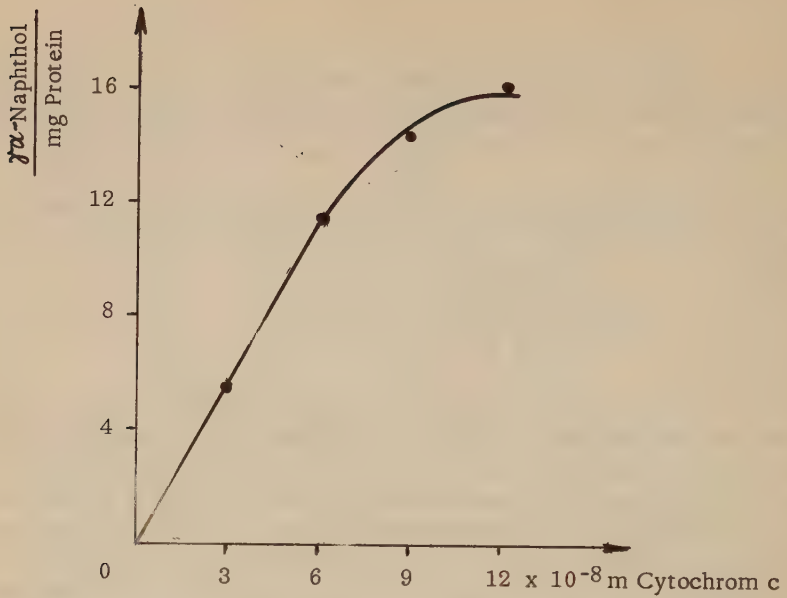


Abb. 4: Abhängigkeit der Indophenolbildung von der Cytochrom-c-Konzentration

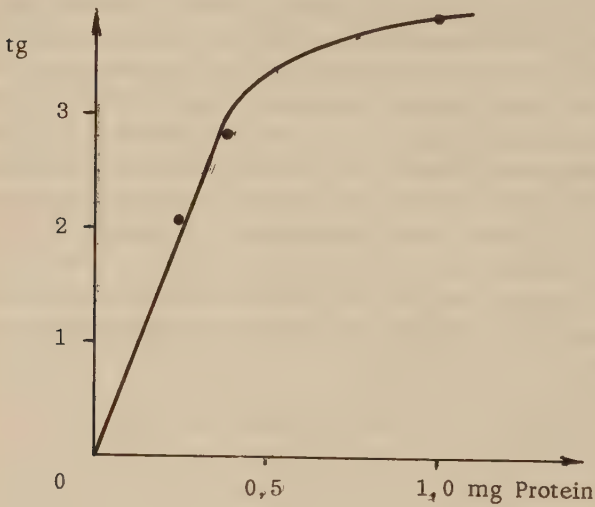


Abb. 5: Abhängigkeit der Indophenolbildung von der Cytochromoxydase-Konzentration

Tabelle 1: Abhängigkeit der Indophenolbildung von der Thyroxinkonzentration (Oxydase I)

Inkubationszeit	Cytochrom-c-Konzentration Mol/Liter	Endkonzentration an Thyroxin Mol/Liter	$\gamma\alpha$ -Naphthol/ mg Protein
6 Minuten	2.5×10^{-8}	0	5.5
		1×10^{-6}	5.1
		5×10^{-7}	5.7
		1×10^{-7}	5.6
	1×10^{-6}	0	17.8
		1×10^{-7}	20.3
		5×10^{-7}	19.4
		1×10^{-6}	16.7

Tabelle 2: Abhängigkeit der Indophenolbildung von der Thyroxinkonzentration (Oxydase III),
nach 30 Minuten Präinkubation bei 37°C

Inkubationszeit	Cytochrom-c-Konzentration Mol/Liter	Endkonzentration an Thyroxin Mol/Liter	$\gamma\alpha$ - Naphthol/ mg Protein
6 Minuten	1×10^{-6}	0	104
		1.66×10^{-8}	109
		6.66×10^{-8}	120
		3.33×10^{-7}	125
		6.66×10^{-7}	117
		6.66×10^{-6}	111

d) Eichkurve zur Bestimmung des "Thyroxinanteils"
an der Geschwindigkeit des Elektronentransportes
durch die Atmungskette

Nachdem die bisherigen Vorarbeiten positive Ergebnisse geliefert hatten, war jetzt der letzte Schritt zu tun, der notwendigerweise zur praktischen Anwendung der erarbeiteten Methode erforderlich war. Wenn die Schilddrüsenhormone den Potentialschritt zwischen dem Cytochrom c und dem Sauerstoff katalytisch beschleunigen, so war zu erwarten, daß sich dieser Hormoneffekt mit Hilfe des neu entwickelten Indophenoltestes von der eigentlichen Oxydasewirkung trennen läßt.

Höhere Cytochrom-c-Konzentrationen steigern natürlich an und für sich schon die enzymatische Farbstoffbildung. Es waren daher mit gereinigten, thyroxinfreien Oxydasepräparaten für beide Messungen Eichwerte zu gewinnen, die sich direkt vergleichen lassen, wobei jeder erhaltene Steigungswinkel (= tg-Wert) einer bestimmten, maximalen α -Naphtholblaubildung zugeordnet werden kann. Bei der Untersuchung thyroxinhaltiger Homogenate mußten sich dann, wenn die Testanordnung brauchbar war, die tg-Werte als vom Thyroxinspiegel unabhängig erweisen (Test 1), während die maximale Farbstoffsynthese parallel mit der vorliegenden Thyroxin-Konzentration ansteigt (Test 2). Test 1 würde also nur die Cytochromoxydase, Test 2 Cytochromoxydase + Thyroxineffekt erfassen. Der "Thyroxinanteil" an der Gesamtreaktion müßte sich dann aus der Differenz errechnen lassen.

Um die Versuchsdurchführung zu vereinfachen, wurde der Test 2 auf die spektrophotometrische Messung umgestellt (12). Diese Bestimmung ist im Eppendorf-Photometer (Filter 546 nm) möglich, weil das Cytochrom c im reduzierten und oxydierten Zustand unterschiedliche Absorptionsverhältnisse aufweist: Die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten von Ferro- und Ferri-Cytochrom c beträgt bei 549,5 nm $1.96 \cdot 10^4$. Der folgende Ansatz wurde verwendet:

In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke wurden pipettiert:

- 2.4 ml Tris-Puffer (p_H 7.4, mit 2.5 mg/ml Titriplex)
- 0.5 ml Cytochrom-c-Lösung (oxydiert, $2 \cdot 10^{-4}$ m)
- 0.1 ml Oxydase

Die Extinktion liegt unter diesen Bedingungen bei 0.21. Jetzt wurde das Cytochrom c in der Küvette mit einem Stäubchen Na-Dithionit reduziert und zur Oxydation eines evtl. Dithionitüberschusses leicht geschüttelt. Die Extinktion steigt nach der Reduktion auf etwa 0.42 an. Nach Zugabe der stark verdünnten Oxydase (Oxydase I z. B. 1 ad 10) wurde mit einer Stoppuhr die Zeit gemessen, die zum Durchlaufen einer Extinktionsdifferenz von 0.01, 0.02, 0.025 und 0.050 benötigt wurde. Bei richtiger Oxydaseverdünnung verläuft der Test bis zu einem E von 0.025 linear. Die Berechnung erfolgte aus dieser Anfangsgeschwindigkeit: Eine Extinktionsänderung von 0.025 entspricht einer Oxydation von 3.1 n Mol Cytochrom c, die jeweils auf 120 Sekunden umgerechnet wurde. Wird diese Extinktionsänderung in x Sekunden erreicht, so sind das in 120 Sekunden

$$\frac{3.1 \cdot 120}{x}$$

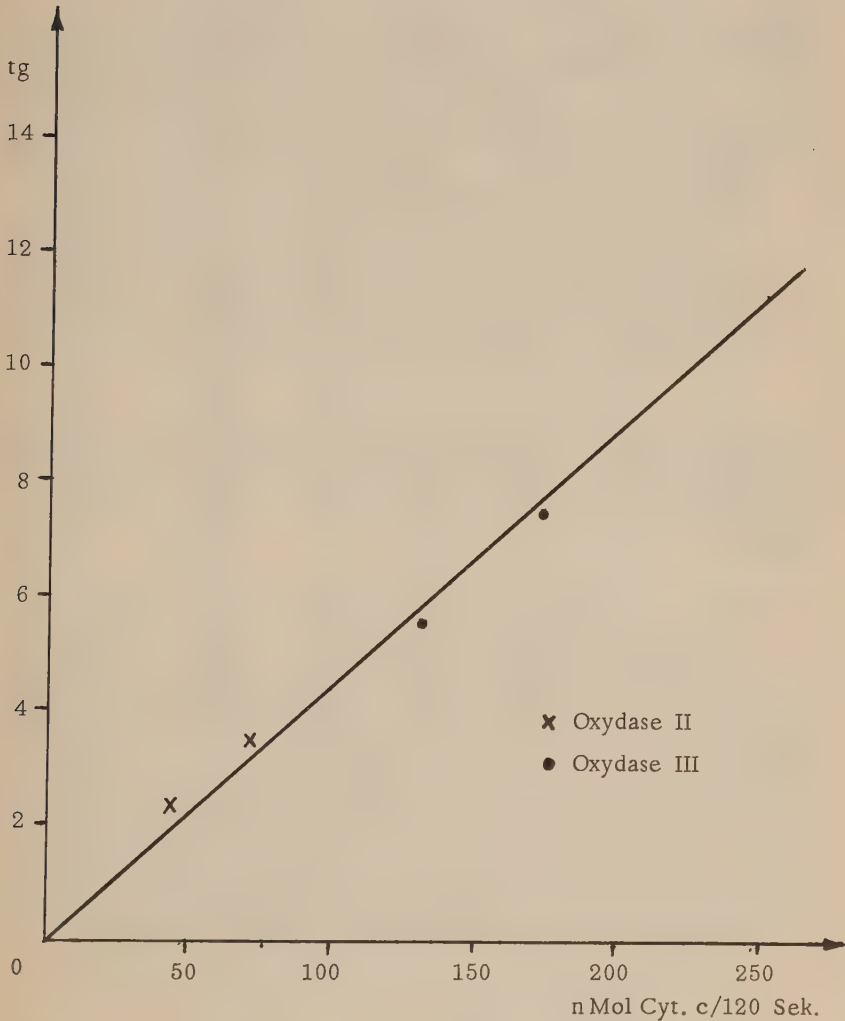
Die so errechneten Werte wurden auf den Proteingehalt des Homogenates bezogen (Kjeldahl-N x 6.25).

Auch hier war - wie bei dem Indophenoltest - zu berücksichtigen, daß während der Reaktionszeit ein bestimmter Anteil des Cytochroms c durch Reduktasen wieder reduziert wird. Diese Reduktion mußte daher parallel zum Oxydationswert getrennt bestimmt werden. Es wurde der gleiche Ansatz bereitet, nach dem Oxydasezusatz bis zu einer Extinktion von 0.375 oxydiert und dann 0.01 ml KCN zugegeben (Endkonzentration an $\text{CN}^- 10^{-3} \text{ m}$). Die Oxydase wird dadurch vollständig gehemmt und die Reduktion kann erfaßt und dem Oxydationswert zugerechnet werden (= korrigierte Cytochrom-c-Oxydation).

Um nun die für die Endauswertung unentbehrliche Eichkurve zu erhalten, wurden die Oxydasen II und III soweit verdünnt, daß in dem beschriebenen optischen Test bei 546 nm eine Extinktionsänderung von 0.025 in 30 - 60 Sekunden registriert wurde. Diese Oxydaseverdünnung konnte dann für beide Verfahren verwendet und die erhaltenen Meßwerte in ein Koordinatensystem eingetragen werden (Ordinate: tg-Wert; Abszisse: n Mol Cytochrom c, oxydiert in 120 Sekunden), woraus sich die in der Abbildung 6 (Seite 23) dargestellte Eichkurve ergab. Wie man sieht, stimmen die mit den unterschiedlichen Oxydasepräparaten erhaltenen Werte gut überein. Die Kurve ließ sich in dieser Form mehrmals reproduzieren und damit als brauchbare

Basis für alle folgenden Messungen verwenden, so daß der Hauptversuch folgen konnte, der die Erprobung dieser Methode bei Ratten mit unterschiedlichem Schilddrüsenhormonspiegel zum Ziele hatte.

Abb. 6: Eichkurve zur Ermittlung des "Thyroxinanteils" an der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation



IV. ERGEBNISSE

Differenzierung zwischen Cytochromoxydaseaktivität und Thyroxineffekt

Die für die folgenden Versuche verwendeten Ratten (Männchen, 250 g Körpergewicht, vgl. S. 9) erhielten entweder normales oder ein mit 0.2% MTU angereichertes "Zuchtfutter grün". Andere Tiere bekamen 24 bzw. 48 Stunden vor dem Versuch 1 x bzw. 2 x 100 mcg L-Thyroxin s.c. Die in der angegebenen Weise bereiteten Leberhomogenate (vgl. S. 10) wurden für den Test 1 1 ad 5 ml, für den Test 2 1 ad 10 ml mit RZ-Lösung verdünnt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 3 (Seite 25) zusammengestellt. Die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation, der tg-Wert und ebenso die mit Hilfe der Differenzmethode aus der Eichkurve (Abb. 6, S. 23) berechneten Werte für die Cytochromoxydaseaktivität und den "Thyroxinanteil" an der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation sind in der Tabelle getrennt aufgeführt.

Um möglichst tiefe Hormonspiegel zu erhalten, wurden die Ratten für eine zweite Versuchsreihe thyreoidektomiert (vgl. S. 9) und anschließend über längere Zeit (bis zu 89 Tage) mit der MTU-Diät gefüttert. Die Tabelle 4 (S. 26) enthält die in diesem zweiten Versuch gewonnenen Ergebnisse.

Bei eingehender Betrachtung der Tabellen wird deutlich, daß der Test 2, also die Messung von Cytochromoxydaseaktivität + Thyroxineffekt, in jedem Falle höhere Werte liefert als der Test 1, was nach den bisherigen Ergebnissen erwartet werden mußte. Auch die Abhängigkeit dieses "Thyroxinanteils" vom jeweiligen Hormonspiegel kommt klar zum Ausdruck: Durch Thyreoidektomie + Zufütterung von MTU über längere Zeit wird der Thyroxinanteil vermindert, durch Thyroxingaben entsprechend erhöht. Es läßt sich errechnen, daß die Cytochromoxydase allein die Geschwindigkeit des Elektronentransportes unter Normalbedingungen nur zu etwa 30% bestimmt. Die übrigen 70% werden erst durch die Anwesenheit der Schilddrüsenhormone, insbesondere des Thyroxins, möglich.

Tabelle 3: Aufteilung der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation in Cytochromoxydaseaktivität und "Thyroxinanteil" und Zusammenhang zwischen dem "Thyroxinanteil" und dem BEJ in der Rattenleber

(Angabe der Cytochrom-c-Oxydation in
n Mol Cyt. c/120 Sek./mg Protein)

BEJ ⁺ mcg Jod/g Protein	Cytochrom-c- Oxydation (korrigiert)	tg	Cyto- chrom- oxydase	"Thyroxin- anteil" abs.	%	Vor- behand- lung
0.673	165	4.2	82	83	50	28 Tage MTU ⁺⁺
0.600	146	3.1	60	86	59	28 " "
0.850	117	2.1	41	76	65	21 " "
0.950	135	2.1	41	94	70	21 " "
1.180	202	3.3	65	137	68	21 " "
0.451	110	3.0	58	52	47	21 " "
1.200	190	3.7	73	117	62	14 " "
1.350	200	1.5	29	171	85	7 " "
1.130	187	2.4	47	140	75	4 " "
1.451	248	3.1	60	188	76	Kontrolle
1.590	266	3.3	65	201	76	Kontrolle
1.190	205	3.8	75	130	64	Kontrolle
1.480	284	4.1	80	204	72	Kontrolle
2.150	329	3.7	73	256	78	1 x 100 mcg L-Thyroxin
1.980	315	3.2	63	252	80	"
1.563	310	3.5	69	241	78	"
2.110	342	3.5	69	273	80	"
2.080	253	2.6	51	202	80	2 x 100 mcg L-Thyroxin

+ BEJ = mit Butanol extrahierbares Jod

++ MTU= Methylthiourazil

Tabelle 4: Aufteilung der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation in Cytochromoxydaseaktivität und Thyroxineffekt (Thyreoidektomie + MTU-Fütterung)

(Cyt. -c-Oxydation in n Mol Cyt. c/120 Sek./mg Protein)

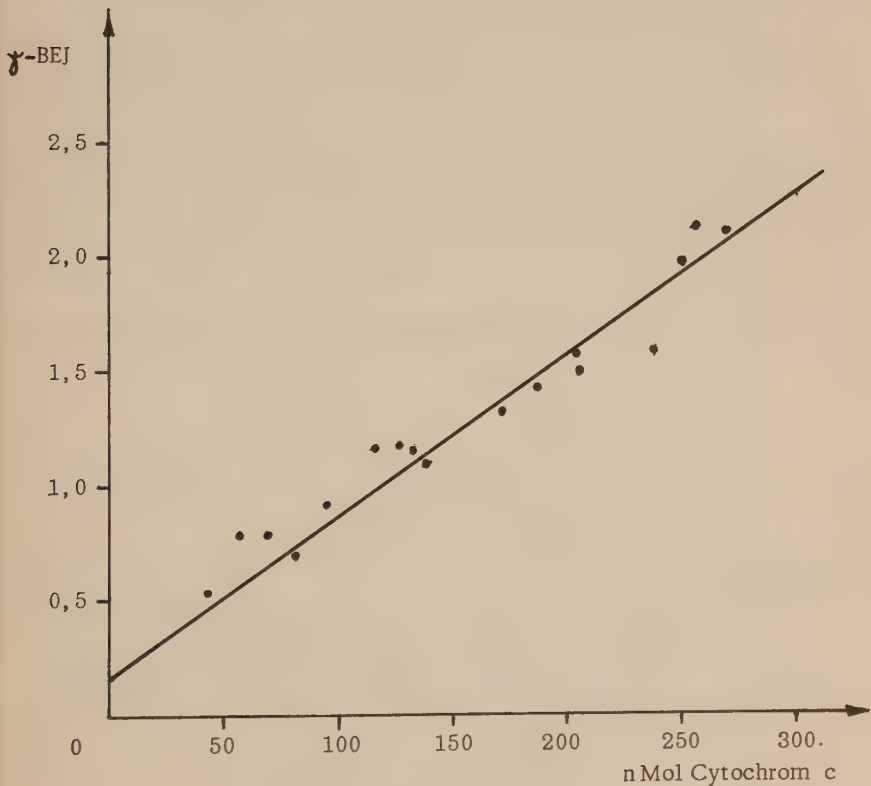
Tage nach Thyreoid- ektomie	Cytochrom-c- Oxydation (korrigiert)	tg	Cytochrom- oxydase	"Thyroxin- anteil"	
				abs.	%
Kontrollen (6 Tiere)	239 (205 - 268)	3.9 (3.1. - 4.6.)	77 (60-91)	162 (145-177)	68 (66 - 71)
1	227	4.8	94	133	59
3	217	4.1	80	137	63
3	181	4.1	80	101	56
4	243	3.7	72	171	70
6	218	3.3	66	152	70
12	178	3.8	75	103	58
51	171	5.1	100	71	42
75	148	5.4	106	42	28
76	143	3.9	76	67	47
78	141	6.4	126	15	11
82	93	5.2	102	u. d. N.	-
83	98	5.0	98	u. d. N.	-
89	176	7.0	138	38	22

Um den Zusammenhang zwischen dem "Thyroxinanteil" und dem Hormonspiegel noch zu verdeutlichen, wurde von SCHOLE (28) parallel das mit Butanol extrahierbare Jod (BEJ) bestimmt, das im wesentlichen als Schilddrüsenhormon-Jod angesprochen werden kann. Trägt man den "Thyroxinanteil" gegen das BEJ auf, so ergibt sich eine bemerkenswerte Abhängigkeit, die auch für die Richtigkeit des methodischen Vorgehens spricht (Abb. 7, S. 27).

Besondere Beachtung verdient weiterhin der Befund, daß sich die Aktivität der Cytochromoxydase 24 Stunden nach Verabreichung von 100 mcg L-

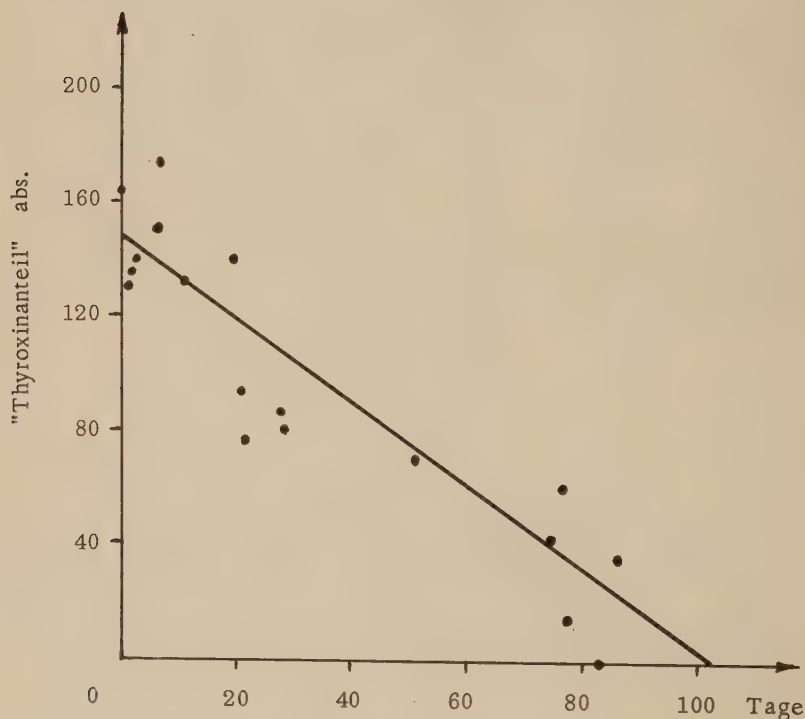
Thyroxin nicht signifikant ändert, während nach Thyreoidektomie und langzeitiger MTU-Zufütterung ein deutliches Ansteigen zu beobachten ist. Die Angaben der Literatur (vgl. S. 2) wären demnach zu revidieren: Schilddrüsenunterfunktion führt wohl zu einem summarischen Absinken des Elektronenflusses, aber offensichtlich nur durch Verminderung der Katalysatorkonzentration, die für die Regulation der Cytochrom-c-Oxydation verantwortlich ist. Die Oxydase-Aktivität wird nicht geringer, sondern eher größer, gewissermaßen als Ausdruck eines Versuches, das Absinken des Thyroxinspiegels durch Vermehrung der Cytochromoxydase zu kompensieren.

Abb. 7: Beziehung zwischen dem Thyroxinanteil an der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation und dem mit Butanol extrahierbaren Jod (BEJ) in der Rattenleber



Schließlich kann man noch aus den Tabellen und Abbildung 8 herauslesen, wie schwer es offenbar ist, wirklich thyroxinfreie Ratten zu erhalten. Nur zwei Tiere der letzten Versuchsreihe konnten nach Thyreoidektomie und über 80tägiger MTU-Fütterung als thyroxinfrei bezeichnet werden. Aber gerade diese Tiere waren am Versuchstage körperlich so geschwächt, daß sie voraussichtlich den folgenden Tag nicht mehr erlebt hätten. Offenbar ist auch ein Absinken des Thyroxinspiegels bis an die Grenze der Nachweisbarkeit mit dem Fortbestand eines Säugerorganismus nicht vereinbar.

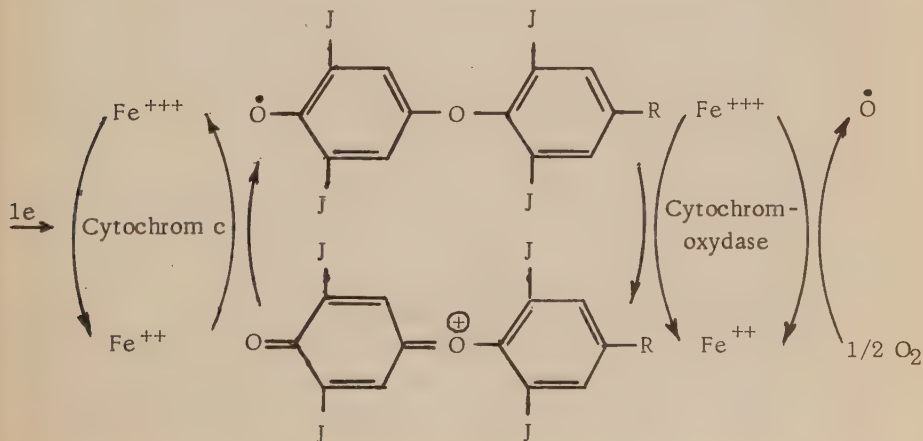
Abb. 8: Abhängigkeit des Thyroxinanteils (an der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation) von der Dauer der MTU-Zufütterung und Thyreoidektomie

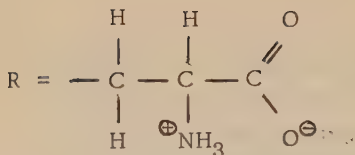


V. DISKUSSION

Die Tatsache, daß der Thyroxineffekt auf den Elektronentransport nur in Gegenwart eines Cytochrom-c-Überschusses in Erscheinung tritt, spricht ebenso wie die Beobachtung, daß der "Thyroxinanteil" an der Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation vom BEJ-Spiegel abhängig ist, für eine Potentialbrückenfunktion der Schilddrüsenhormone und gegen eine direkte Stimulierung der Cytochromoxydase. Da das Redoxpotential des Thyroxins mit + 0.380 V zwischen dem Cytochrom c und dem Sauerstoff liegt und da die stimulierende Wirkung auch tatsächlich in einem Cytochrom c oxydierenden System - abhängig von der Cytochrom-c-Konzentration - auftritt, wird die Wahrscheinlichkeit außerordentlich groß, daß diese mit 0.520 V größte Potentialdifferenz der Atmungskette durch die Schilddrüsenhormone überbrückt und dadurch die Aktivierungsenergie der Elektronenübertragung in dieser dritten Stufe vermindert wird: Die Elektronen, die von den hydrierten Pyridinfermenten über die Flavinenzyme und das Ubichinon dem Cytochrom c zugeführt werden, erreichen den Sauerstoff schneller, wenn als Zwischenstufe das Thyroxin oder Trijodthyronin zur Verfügung steht. Dabei scheint sich der Redoxprozeß zwischen dem Chinon und dem Semichinonradikal abzuspielen, denn das phenolische Hydroxyl der Thyroninderivate ist verhältnismäßig reaktionsträge und reduziert die Cytochromoxydase nur sehr langsam.

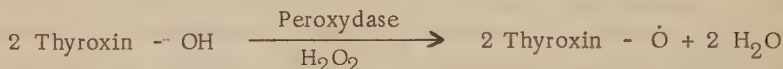
Die Atmungskette wäre dann folgendermaßen zu formulieren::





Bei der Betrachtung dieses Redoxprozesses tritt die Frage auf, über welche Möglichkeiten die Zelle verfügt, das Phenol in das entsprechende Chinon zu überführen. Offensichtlich braucht nur ein Elektron abgelöst zu werden, da das zweite ja von der Cytochromoxydase übernommen werden kann.

Auf einen Weg wurde schon im Rahmen der Literaturübersicht hingewiesen: Die in jeder Zelle vorkommenden Katalasen und Peroxydasen können die Oxydation einleiten, wenn z. B. bei der Aminosäuren- und Amino-oxydation Hydroperoxyd entsteht:



Eine zweite Möglichkeit, der vermutlich besondere Bedeutung zukommt, besteht in der Interferenz mit gelben Fermenten. Der Redoxprozeß der Flavinenzyme verläuft auch über ein intermediär auftretendes Semichinonradikal, das nach den von SCHOLE (28) angegebenen experimentellen Daten mit Phenolen reagieren kann. Als Beispiel einer derartigen Reaktion wurde die Wechselwirkung zwischen der D-Aminosäureoxydase und dem Antibiotikum Aureomycin verfolgt. Alle vorgenommenen Messungen sprechen dafür, daß die während des Redoxvorganges sich ausbildende Semichinonform des Isoalloxazins die am C-Atom 5 des Aureomycinmoleküls haftende Hydroxylgruppe radikalisch oxydiert und daß das entstehende, besonders reaktionsfähige Aureomycinradikal durch eine SH-Gruppe des Apo-Fermentproteins wieder reduziert wird, wodurch die Aminosäureoxydase, deren SH-Gruppen für die Fermentwirksamkeit essentiell sind, inaktiviert wird. Ähnliche Reaktionsmöglichkeiten scheinen auch für das Thyroxin-Hydroxyl zu existieren. Nach Angaben von RAD SMA und Mitarb. (29) hemmt Thyroxin, das in Konzentrationen von 100 mcg/ml Gewebehomogenaten zugesetzt wurde, die Oxydation der reduzierten Pyridinnukleotide. Die Entfärbungszeit für Methylenblau, das die Elektronen aus der Flavinstufe entnehmen kann, war besonders auffällig herabgesetzt, und Versuche mit zusammengesetzten, übersichtlichen Systemen (Mitochondrien + Substrat + DPN + Methylenblau) zeigten deutlich, daß der Redoxprozeß der Flavoproteide gehemmt wurde. Auch der viel diskutierte entkoppelnde Effekt

des Thyroxins auf die Atmungskettenphosphorylierung würde durch eine derartige "Phenol-Hemmung" der Atmungsketten-Flavoproteide verständlich. Denn die ersten beiden Phosphorylierungsstufen sind mit dem Elektronentransport vom NAD-H zum Flavoprotein und demjenigen vom Flavoprotein zum Cytochrom c gekoppelt, also an das intakte Flavinenzym gebunden, während der letzte Schritt (Cytochrom c $\longrightarrow$ O₂) von gelben Fermenten unabhängig ist. Von SCHOLE (30) konnte entsprechend nachgewiesen werden, daß die bei steigendem Thyroxinangebot zu beobachtende Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung nur zwei Stufen erfaßt, während die dritte auch bei sehr hohem Angebot an Schilddrüsenhormonen weitgehend unbeeinflußt bleibt.

Es wird weiteren Untersuchungen vorbehalten sein, geeignete Methoden zu finden, die einen direkten Nachweis der Redoxfunktion des Thyroxins unter Erfassung der dabei auftretenden Zwischenstufen ermöglichen, und mit denen weiterhin bewiesen werden kann, auf welchem Wege die Primäroxydation des phenolischen Hydroxyls eingeleitet wird. Denn eine endgültige Aussage über die Wirkungsweise der Schilddrüsenhormone kann erst nach Klärung dieser noch offenen Fragen getroffen werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht zu entscheiden, ob die bekannte Stimulierung der Atmungskette durch die Schilddrüsenhormone als direkte Aktivierung bzw. als Förderung einer Neusynthese der Cytochromoxydase oder als Katalyse des Elektronentransportes vom Cytochrom c zum Sauerstoff ("Potentialbrückeneffekt") zu verstehen ist.

Um einer Klärung dieser Frage näher zu kommen, wurde an erster Stelle ein Verfahren entwickelt, das eine Messung der Cytochromoxydase ohne Störung durch eine evtl. Schilddrüsenhormonkatalyse erlaubt. Der Indophenoltest nach STRAUS (27) erwies sich als brauchbar, wenn die Cytochrom-c-Konzentration die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion begrenzt. Die Indophenolbildung nimmt dann mit steigender Cytochrom-c-Konzentration linear zu und der tg des Steigungswinkels kann als Maß für die Oxydase-Aktivität verwendet werden. Bei dieser Testanordnung bleibt der Elektronentransport von Thyroxinzusätzen unbeeinflusst, während das Hormon in Gegenwart eines Cytochrom-c-Überschusses eine signifikante Stimulierung bewirkt. Mit dieser Versuchsanstellung wird also im ersten Fall nur die Cytochromoxydase, im zweiten Fall die Oxydase gemeinsam mit einem evtl. vorhandenen Zusatzkatalysator erfaßt. Die Eichung des Verfahrens wurde mit einer thyroxinfreien, spektral einheitlichen Cytochromoxydase vorgenommen.

Die Anwendung dieser Methode auf Leberhomogenate von Ratten mit unterschiedlichen Thyroxinspiegeln (normale, thyreoidektomierte, Thiourazil-gefütterte und mit Thyroxin behandelte Tiere) führte zu dem Ergebnis, daß sich die Geschwindigkeit der Cytochrom-c-Oxydation prinzipiell in zwei Komponenten zerlegen läßt:

1. die Wirkung der Cytochromoxydase und
2. die Wirkung eines Zusatzkatalysators, der nur bei hoher Cytochrom-c-Konzentration in Erscheinung tritt und daher höchstwahrscheinlich als Potentialbrücke zwischen dem Cytochrom c und dem Sauerstoff fungiert.

Die erste Komponente ist vom Schilddrüsenhormonspiegel weitgehend unabhängig, während die zweite einen linearen Zusammenhang mit der Jod-Thyronin-Konzentration aufweist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, daß sich die Schilddrüsenhormone als Redoxsysteme zwischen dem Cytochrom c und der Cytochromoxydase bzw. dem Sauerstoff in die Atmungskette einordnen und dadurch den Stoffwechsel regulieren. Das Redoxpotential (E'_0) von + 0.380 V liefert die theoretische Voraussetzung für eine solche Wirkungsweise. Der Redoxprozeß scheint sich zwischen dem Semichinonradikal und der chinoiden Form dieser Hormongruppe abzuspielen. Der Beweis für diese Annahme kann allerdings nur durch zusätzliche Versuche erbracht werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Martius, C.
5. Colloquium d. Ges. f. phys. Chemie, Mosbach 1955
2. Martius, C., B. Hess
Arch. Biochem. Biophys. 33, 486 (1951)
3. Feldott, G., H.A. Lardy
Federation Proc. 10, 182 (1951)
4. Sokoloff, L., S. Kaufmann
Science 129, 569 (1959)
5. Sokoloff, L., S. Kaufmann, H.V. Gelbosin
Biochem. Biophys. Acta (Amsterdam) 52, 410 (1961)
6. Bronk, J.R., M.S. Bronk
J. biol. Chem. 237, 897 (1962)
7. Hess, B.
Wiss. Konferenz d. Ges. Deutsch. Naturforscher u. Ärzte,
Rottach-Egern (1962)
8. Schole, J.
Unveröffentlichte Versuche
9. Dye, J.A., R.A. Waggener
Amer. J. Physiol. 85, 1 (1928)
10. Markoff, G.N.
Beitr. path. Anat. 94, 377 (1935)
11. Tipton, S.R., W.L. Nixon
Endocrinology 39, 300 (1946)
12. Schole, J.
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. phys. Chem. 317, 281 (1959)

13. Niemann, C., C.E. Redemann
J. Amer. Chem. Soc. 63, 1549 (1941)
14. Lagerspetz, K., L. Viili
Ann. med. exper. et biol. fenn. 35, 131 (1957)
15. Sproull, D.H.
Biochem. J. 66, 527 (1957)
16. Frieden, E., R. Flitman
Arch. of Biochem. Biophys. 64, 513 (1956)
17. Gemmil, C.L.
Amer. J. Physiol. 167, 349 (1951)
18. Klebanoff, S.J.
J. Biol. Chem. 234, 2480 (1959)
19. Akazawa, T., E.E. Conn
J. Biol. Chem. 232, 403 (1958)
20. Klebanoff, S.J.
J. Biol. Chem. 234, 2437 (1959)
21. Wou G. NG, W. Marx
Endocrinology 70, 669 (1962)
22. Wainfan, E., W. Marx
J. Biol. Chem. 214, 441 (1955)
23. Keilin, D., E.F. Hartree
Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 125, 171 (1938)
24. Fowler, L.R., S.H. Richardson, Y. Hatefi
Biochem. Biophys. Acta 64, 170 (1962)
25. Crane, F.L., J.L. Glenn, D.E. Green
Biochem. Biophys. Acta 22, 475 (1956)

26. Griffiths, D.E., D.C. Wharton
J. Biol. Chem. 236, 1850 (1961)
27. Straus, W.
J. Biol. Chem. 207, 733 (1954)
28. Schole, J.
Habilitationsschrift 1963
29. Radsma, W., G.G. Bruggink, A. de Bruin, A.G. Hilvers
Acta physiol. et pharmacol. neerl. (Amsterdam)
5, 319 (1957)
30. Schole, J.
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. phys. Chem. 323, 1 (1961)

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich es nicht versäumen, Herrn Professor Dr. Dr. Johannes Brüggemann für die Überlassung des Themas und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Institut meinen Dank auszusprechen.

Herrn Privatdozent Dr. Dipl.-Chem. Jürgen Schöle möchte ich für die jederzeit gewährten Unterstützungen und Anregungen besonders herzlich danken.

LEBENS LAUF

Am 15. Februar 1938 wurde ich als Sohn des Schmiedemeisters und Landmaschinenhändlers Josef Wenninger und seiner Ehefrau Therese, geborene Leinfelder, in Wemding/Bay. geboren.

Nach Beendigung der 5. Klasse der Volksschule in Wemding besuchte ich die Oberrealschule in Nördlingen, wo ich 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1959 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Veterinärmedizin, das ich im Juli 1964 mit dem Tierärztlichen Staatsexamen beendete.

